

Beiträge zur Ermittlung der Primärstruktur der Streptokinase

Dr. rer. nat. Horst Bayreuther

1977

Aus dem biochemischen Laboratorium der
Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

Beiträge zur Ermittlung der Primärstruktur der Streptokinase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Horst Bayreuther
aus Selb

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München



Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hochstraßer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. H. Naumann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 1977

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1975 bis Juni 1977 an der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.H. Naumann, Direktor der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer danke ich für die Zuteilung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Do. Dr. G. Bretzel für seine wertvollen Anregungen und die ständige Unterstützung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1. Streptokinase, physiologische Aspekte	1
1.2. Streptokinase, biochemische Aspekte	8
1.3. Aufgabenstellung	11
2. Spaltung der Streptokinase und Trennung der Fragmente	13
2.1. Bromcyanspaltung	13
2.2. Auftrennung der Bromcyanpeptide am Molekülsieb	15
2.3. Citraconylierung	16
2.4. Trypsinspaltung	17
2.5. Auftrennung der tryptischen Peptide	19
3. Ausgangsmaterialien und Apparaturen	21
4. Versuchsbeschreibung und Versuchsergebnisse	22
5. Diskussion	34
6. Zusammenfassung	36
7. Literaturverzeichnis	37

1. Einteilung und Aufgabenstellung

1.1. Streptokinase, physiologische Aspekte

Die Streptokinase¹⁾ ist ein enzymartiger Faktor der pyogenen Streptokokken, der Plasminogen in Plasmin überführt und dadurch Fibrinolyse bewirkt.

Therapeutisch wird sie zur Verflüssigung von Thromben verwendet.

Die Streptokinase ist kein Enzym im strengen Sinne²⁾. Sie katalysiert die Aktivierung von Plasminogen nicht direkt, sondern über ein Intermediärprodukt, das bei der Wechselwirkung mit Humanplasminogen entsteht³⁾. Erst dieses Zwischenprodukt ist ein Enzym, das vergleichbar mit den körpereigenen Aktivatoren Plasminogen unmittelbar zu Plasmin umwandelt⁴⁾.

Diese Reaktion ist durch die Spaltung einer bestimmten Arginyl-Valin-Bindung im Plasminogen gekennzeichnet⁵⁾.

Nur wenige Spezies besitzen ein Plasminogen, das mit der Streptokinase einen Aktivator bildet. Das Humanplasminogen bildet sowohl mit Streptokinase einen Aktivator, als auch Plasmin³⁾.

Die Bildung des durch Streptokinase induzierten Aktivators beginnt mit einer stöchiometrischen Assoziation von Plasmi-

nogen und Streptokinase. Dabei entsteht ein Komplex, der physikalisch-chemisch eindeutig charakterisiert ist und Aktivator-Spezifität hat;^{6) 7)} er katalysiert die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin.

Der Komplex ist in Harnstoff dissoziabel⁸⁾; dabei werden unter Verlust der Aktivatorspezifität Plasmin und Streptokinase freigesetzt, die einer schnellen Autolyse unterliegen⁹⁾. Der Streptokinase-induzierte Aktivator²⁾ ist als stöchiometrischer Komplex aus Proaktivator-Plasminogen und Streptokinase charakterisiert; er bildet sich auch bei 0° C, stabilisiert sich aber erst in einer temperaturabhängigen Reaktion. In der Stabilisierungsphase des Aktivators entsteht proteolytische Aktivität, die man in der Fibrinagar-Elektrophorese neben dem Aktivator nachweisen kann. Die an das Humanplasminogen gebundene Streptokinase ist gegen Hydrolyse geschützt und der Aktivator relativ stabil. Er wird im Serum von Menschen gefunden, die mit Streptokinase behandelt wurden; im Gegensatz zu Plasmin wird er von Antiplasminen nicht inaktiviert.

Bei der Überführung von Plasminogen in Plasmin durch katalytische Mengen von Streptokinase bzw. Urokinase werden zwei charakteristische Peptidbindungen gespalten¹⁰⁾. Man erhält Plasminmoleküle, die drei Peptidketten mit einem Molekulargewicht von 60 000, 20 000 und 5 000 enthalten.

Die Reaktionsordnung verläuft nach folgendem Schema:

Plasminogen (MG 85 000) —————> Plasminogen (MG 80 000)
+ Plasminogen (MG 5 000) —————> Plasmin (MG 60 000) +
+ Plasmin (MG 20 000) + Plasmin (MG 5 000).

Versetzt man Plasminogen mit einer stöchiometrischen Menge an Streptokinase ¹⁰⁾, so erhält man einen Plasminogen-Aktivatorkomplex von der Zusammensetzung:

Streptokinase (MG 37 000, 6 000 und 4 000). Plasmin
(MG 60 000, 20 000 und 5 000).

Innerhalb dieses Komplexes haben wir folgende Spaltungsreaktionen:

Plasminogen (MG 85 000) —————> Plasminogen (MG 65 000)
+ Plasminogen (MG 20 000) —————> Plasmin (MG 60 000) +
+ Plasmin (MG 20 000) + Plasmin (MG 5 000).

Das Reaktionsschema bei der Umwandlung zeigt Unterschiede, je nachdem, ob katalytische oder stöchiometrische Mengen an Streptokinase eingesetzt werden. Die Streptokinase innerhalb des Komplexes spaltet in drei Teile zu 37 000, 6 000 und 4 000 Molekulargewicht:

Streptokinase (MG 47 000) —————> Streptokinase (MG 43 000,
4 000) —————> Streptokinase (MG 37 000, 6 000, 4 000).

Endgruppenstudien des isolierten Komplexes Streptokinase (MG 37 000, 6 000, 4 000). Plasmin (MG 60 000, 20 000, 4 000) zeigen eine Peptidfolge von (N) - Streptokinase (6 000) - (37 000) - (4 000) - (C) für Streptokinase (47 000) und (N) - Plasmin (5 000) (60 000) - (20 000) für Plasminogen (85 000) wobei (N) - und - (C) die N- und C-terminale Stellung anzeigen soll¹⁰⁾.

Vergleicht man die Eigenschaften¹¹⁾ der Streptokinase vor und nach der Reaktion mit dem Plasminogenaktivatorkomplex, nachdem man sie von diesem wieder isoliert hat, so stellt man fest, daß das Molekulargewicht vorher 44 000 und nachher 36 000 beträgt. Das entspricht einem Wert von 3.03 bzw. 2.82 S.

Die ursprüngliche Streptokinase hat einen N-terminalen Isoleucin und einen C-terminalen Lysinrest, während sie nach der Reaktion mit dem Komplex und anschließender Abtrennung einen N-terminalen Serin- und einen C-terminalen Lysinrest besitzt.

Die N-terminale Aminosäuresequenz der ursprünglichen Streptokinase ist NH_2 - Ile - Ala - Gly - Pro - Glu - Trp - Leu - Leu - Asp - Arg - Pro - Ser, und die der veränderten ergibt sich als NH_2 - Ser - Lys - Pro - Phe - Ala - X - Asp - Ser - Gly - Ala - Met - Ser.

Es ist anzunehmen, daß bei der Reaktion der ursprünglichen Streptokinase mit Plasminogen oder Plasmin diese ein N - terminales Peptid, oder mehrere mit einem ungefähren Molekulargewicht von 8 000 verliert¹¹⁾.

Ebenso wird auf Grund physikalischer Untersuchungsmethoden, wie Circular dichroismus und optische Rotationsdispersionsanalyse auf eine Konformationsänderung hingewiesen.

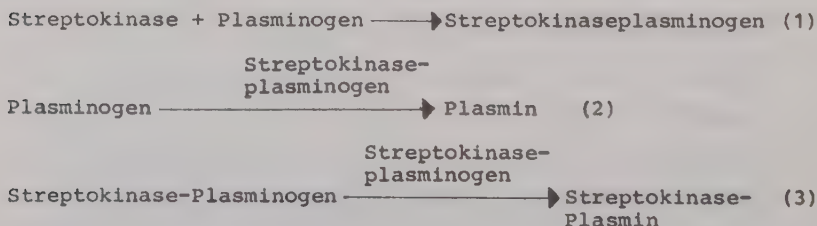
Dabei sollen sowohl die ursprüngliche, wie auch die veränderte Streptokinase zur Aktivierung des Plasminogens führen. Höchstwahrscheinlich sitzt das aktive Zentrum nicht im Streptokinaseanteil des Aktivatorkomplexes¹¹⁾.

Sowohl Plasmin als auch Plasminogen können einen Aktivator-komplex mit Streptokinase bilden¹²⁾. Der Streptokinase-induzierte Aktivator ist das eigentliche Agens der Thrombolysetherapie mit Streptokinase; er ist während der Therapie im Blut des Patienten nachweisbar²⁾. Der Aktivator-komplex hat andere Bindungs- und Substratspezifitäten als Plasmin: Im Gegensatz zu Plasmin wird er von den Plasmin-inhibitoren des Blutes nicht inaktiviert; er ist nicht proteolytisch wirksam und katalysiert im Vergleich zur Streptokinase die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin direkt. Das aktive Zentrum im Plasminogen-Streptokinase-komplex ist bereits vorhanden, bevor dieser in Plasmin-streptokinase überführt wird, bevor die einzelnen Peptidketten des Plasminogens abgespalten sind und bevor proteolytische Aktivität entsteht¹²⁾.

Der Nachweis dieses Zentrums wurde mit p-Nitrophenyl-p-Guanidinbenzoat erbracht, das dieses spezifisch blockiert. Versetzt man in Gegenwart dieses Reagens Plasminogen mit einer steigenden Menge an Streptokinase, so erhält man die äquivalente Menge an inaktivem Plasminogen. Wir haben es hier mit einer stöchiometrischen Reaktion von Plasminogen mit p-Nitrophenyl-p-Guanidinbenzoat zu tun¹²⁾.

Der Übergangskomplex Streptokinase-Plasminogen spielt eine bedeutende Rolle in der Aktivierung des Humanplasminogens durch Streptokinase. Die Bildung dieses Komplexes ist nicht auf die Anwesenheit von Plasmin angewiesen¹²⁾.

Folgender Mechanismus für die Aktivierung des Humanplasminogens durch Streptokinase wurde vorgeschlagen¹²⁾:



Pankreasinhibitor vom Rind (Trasylol) blockiert sowohl die Aktivatoraktivität, als auch das Reaktionsvermögen mit p-Nitrophenyl-p-Guanidinbenzoat.

Dies wird nicht durch die Abspaltung der Streptokinase, sondern durch die Bildung eines ternären Streptokinase-Plasminogen-Inhibitorkomplexes bewirkt.

Die Streptokinase zeigt mit bestimmten Antikörpern von Kaninchen eine einzelne Bande in der Immunelektrophorese⁹⁾.

1.2. Streptokinase, biochemische Aspekte

Das Molekulargewicht der Streptokinase wird mit 47 600 angegeben¹³⁾. Es wurde durch Gleichgewichtssedimentation bestimmt. Behandelt man Streptokinase bei pH 7.5 in 0.1 M - Phosphatpuffer mit 5 M-Guanidinhydrochlorid- oder 8 M-Harnstofflösung, so erniedrigt sich der Sedimentationskoeffizient, ohne daß sich das Molekulargewicht wesentlich ändert.

Es wird angenommen, daß das Molekül aus einer einzelnen Polypeptidkette ohne Untereinheiten besteht. Weder Cystin noch Cystein wurde in der Aminosäureanalyse gefunden¹³⁾. Daraus ist abzuleiten, daß die Streptokinase nicht aus über mehrere S-S-Brücken gebundenen Ketten bestehen kann.

Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4.7. Die Zusammensetzung der Aminosäuren stimmt mit der Formel $\text{Asp}_{68} - \text{Thr}_{30} - \text{Ser}_{24} - \text{Glu}_{46} - \text{Pro}_{20} - \text{Gly}_{21} - \text{Ala}_{23} - \text{Val}_{23} - \text{Met}_3 - \text{Ile}_{22} - \text{Leu}_{40} - \text{Tyr}_{20} - \text{Phe}_{15} - \text{Lys}_{33} - \text{His}_9 - \text{Arg}_{21} - \text{Try}_1$ für ein Molekulargewicht von 47 754 überein. Durchschnittlich wurden 60 Asparagin- und Glutaminreste pro Proteinmolekül gefunden.

Die reinsten Präparate der Streptokinase sind karbonat- und phosphorfrei.

Die Streptokinase selbst besitzt keine proteolytische Aktivität; sie ist inaktiv gegen synthetische Substrate, wie basische Aminosäureester, Naphtylester und Acetyltyrosinäthylester, und ebenso gegen natürlich vorkommende Proteasensubstrate.

Eine weitere Studie¹⁴⁾ beschäftigte sich bereits mit der Primärstruktur der Streptokinase, der Aminosäurezusammensetzung und der terminalen Aminosäuren.

Das Molekül enthielt alle gängigen Aminosäuren, außer Cystin und Cystein.

Als N-terminale Aminosäuresequenz wurde Ile-Ala-Gly, als C-terminale Aminosäure Lysin gefunden.

Die Analyse ergab vier Methioinreste pro Molekül. Da Bromcyan das Peptid am Methionin durch Reaktion mit dem Schwefel im Thioäther der Seitenkette spaltet, ergeben sich fünf Fragmente.

Die Trennung erfolgte durch wiederholte Gelfiltration chromatographisch auf Sephadex G 150, G 100, G 75 und G 50 in 1 M - Essigsäure.

Die einzelnen Fragmente wurden durch die Aminosäurezusammensetzung, die N-terminale Aminosäuresequenz, die C-terminale und durch das Molekulargewicht bestimmt.

In der Tabelle I werden die Resultate der Aminosäuren-analyse von Morgan und Henschen¹⁴⁾ unseren eigenen Befunden gegenübergestellt.

Eines der Fragmente hatte die gleiche N-terminale Tripeptidsequenz wie die gesamte Streptokinase, und ist somit typisch für den N-terminalen Teil der gesamten Struktur. Ein zweites Fragment enthielt kein Homoserin, und hatte die gleiche C-terminale Aminosäure wie die Streptokinase und stammt somit vom C-terminalen Teil der gesamten Struktur ab.

Die N- und C-terminale Aminosäuresequenz wurde mit dem Sequenator nach der Methode von Edmann und Begg²⁰⁾ bzw. Dopheide, Moore und Stein²¹⁾ analysiert.

1.3. Aufgabenstellung

Endziel einer jeden Molekülaufklärung ist es, dieses sowohl quantitativ als auch qualitativ, strukturell und physikalisch zu analysieren.

Ein Molekül wie die Streptokinase, mit einem Molekulargewicht von ca. 40 000, muß in Bruchstücke zerlegt werden, um aus diesen erhaltenen Bausteinen Informationen über ihre Zusammensetzung zu erhalten.

Im Arbeitskreis von Prof. K. Hochstraßer wird seit einiger Zeit die Primärstruktur der Streptokinase untersucht.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, die Streptokinase durch Bromcyan an den Methioninresten zu spalten, die Bruchstücke zu trennen und eines davon, das sogenannte Fragment 3, das den N-terminalen Teil der Streptokinase enthält, weiter zu fragmentieren, um kleinere, für die Sequenzierung geeignete Peptide zu erhalten.

Diese weitere Fragmentierung soll durch enzymatische Spaltung mittels Trypsin erfolgen. Da Trypsin ein Peptid nicht nur an den Argininresten, sondern auch an den Lysinresten spaltet, man aber wiederum nicht so viele Bruchstücke erhalten will, ist es nötig, die Lysinreste vorher mit Citraconsäureanhydrid zu blockieren; man erhält dann die gewünschte Spaltung ausschließlich an den Argininresten.

Eine Auftrennung der Fragmente soll säulenchromatographisch über Molekülsiebe und Biogel erfolgen.

Die einzelnen Bruchstücke werden nach Hydrolyse auf dem automatischen Aminosäureanalysator charakterisiert.

2. Spaltung der Streptokinase und Trennung der Fragmente

2.1. Bromcyanspaltung

BrCN reagiert mit dem Schwefel im Thioäther der Seitenkette des Methionins¹⁵⁾. Die Reaktionsprodukte sind ein Gemisch aus Homoserin, Homoserinlacton und Methylthiocyanat.

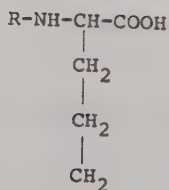
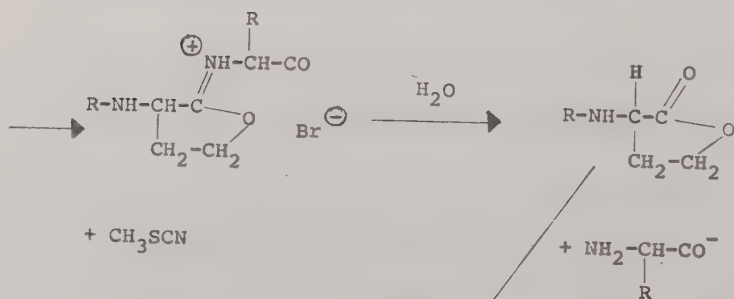
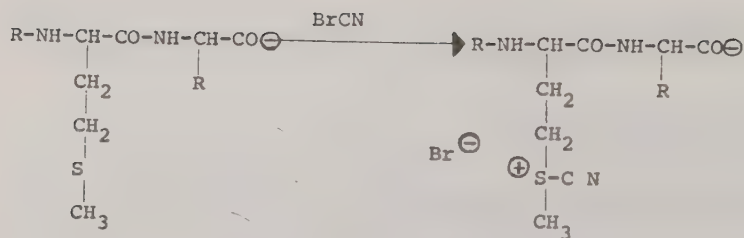
Ist das Methionin in einer Peptidkette, so wird die Peptidbindung an der Carbocylgruppe des Methionins gespalten.

Da die BrCN-Spaltung sehr spezifisch ist und da meist sehr wenige Methionine in einem Peptid enthalten sind, bekommt man relativ große Bruchstücke, was häufig die Positions- und Konstitutionsbestimmung erleichtert.

Alle Fragmente, mit Ausnahme des C-terminalen Peptids, enthalten nach der Spaltung ein dem Methioninanteil entsprechendes C-terminales Homoserin bzw. Homoserinlacton.

Haben wir kein C-terminales Methionin, so erhält man aus n -Methioninen $(n + 1)$ Bruchstücke.

Die Reaktion ist aus dem folgenden Reaktionsschema ersichtlich:



2.2. Auftrennung der Bromcyanpeptide am Molekülsieb

Nach den vorliegenden Aminosäureanalysen der Streptokinase¹⁴⁾ enthält diese 4 Methioninreste. Danach resultieren nach Einwirkung von BrCN fünf Fragmente. Bei einem Molekulargewicht von ca. 40 000 ergibt sich pro Bruchstück ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 8 000. Bei dem Molekülsieb der Wahl sollten Peptide dieser Größenordnung etwa in der Mitte des zur Verfügung stehenden Fraktionierungsbereichs eluiert werden.

Hier bietet sich das Gel Sephadex G75 an.

Die Versuche bestätigten diese Annahme, es zeigte sich aber, daß im Bereich der höheren Molekulargewichte bei Verwendung von Sephadex G 100 eine bessere Fraktionierung erreichbar war, ohne daß sich dabei die Qualität der Trennung der kleineren Peptide verschlechterte.

Obwohl die Peptide alle in 1 N-Essigsäure in Lösung zu bringen waren, wurde dem Elutionsmittel 6.75 M-Harnstoff zugesetzt, um Aggregationen zwischen den Peptiden zu verhindern. Der Harnstoff wurde anschließend aus den jeweils vereinigten Fraktionen auf Biogel P 2, Elutionsmittel 30 %ige Ameisensäure wieder abgetrennt. Die Aminosäurezusammensetzung wurde ermittelt (siehe Tabelle Nr. I).

2.3. Citraconylierung

Maleinsäureanhydrid azyliert α - und ϵ -Aminogruppen in Proteinen bei milden alkalischen Bedingungen^{16) 17)}. Citraconsäureanhydrid (2-Methylmaleinsäureanhydrid)¹⁸⁾ reagiert ähnlich, kann aber auf Grund der geringen Bindungsstärke wieder schneller vom Lysin abgespalten werden. Die Citraconylierung des Lysylrestes erlaubt eine spezifische Spaltung der Argininbindung durch Trypsin. Die Bindung zwischen der Citraconsäure und der ϵ -Aminogruppe des Lysins ist bei alkalischem pH stabil und erlaubt eine ausschließliche Fragmentierung am Argininrest durch Trypsin. Die Citraconsäure kann aus jeder Lysinbindung durch Ansäuern wieder entfernt werden, um eventuelle weitere tryptische Fragmente zu erhalten.

2.4. Trypsinspaltung

Trypsin zeigt die höchste Substratspezifität für eine Endopeptidase¹⁹⁾. Nur die Carboxylbindung von Lysin und Arginin wird hydrolysiert. Kennt man die Aminosäuren eines Peptids, so kann man durch die Trypsinspaltung die Zahl der tryptischen Peptide eines Moleküls erhalten. Theoretisch ist die Zahl der erhaltenen Bruchstücke gleich der Anzahl der im Molekül enthaltenen Lysine und Arginine, dazu ein C-terminales Peptid.

Die Ausbeute an tryptischen Peptiden hängt von der unmittelbaren Nachbarschaft der Seitenketten und deren chemischen Eigenschaften ab.

Im allgemeinen senkt die Nähe polarer Gruppen den Hydrolyseerfolg. Seitenketten mit einer negativen Ladung (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure usw.) in der Nähe eines Lysin- oder Argininrestes erschweren die Hydrolyse erheblich.

Liegen zwei oder mehrere Lysine und/oder Arginine nebeneinander, so dauert die Spaltung beträchtlich länger.

Peptidbindungen, die den Iminostickstoff des Prolins enthalten, z.B. Lys-Pro oder Arg-Pro sind gegenüber der tryptischen Hydrolyse resistent. Nach Beendigung der Spaltung wird das Trypsin durch Aufkochen denaturiert, um die Mög-

lichkeit weiterer Reaktionen an den Lysinresten zu verhindern.

Nach dem Lyophilisieren erfolgt die Abspaltung der Citraconsäurereste durch Inkubation mit 1 N-Essigsäure.

2.5. Auftrennung der tryptischen Peptide

Die niedermolekulare Citraconsäure sollte in 30 %iger Ameisensäure auf Sephadex G10 - Gel abgetrennt werden. Es gelang jedoch nicht, das gesamte Material in Lösung zu bringen.

Der unlösliche Rückstand wurde abzentrifugiert und der gelöste wie beabsichtigt auf Sephadex - G10 - Gel chromatographiert.

Die Kontrollanalyse der Aminosäurezusammensetzung zeigte, daß, wie zu erwarten, nur ein Teil der tryptischen Peptide gelöst war.

In dem Peptidmaterial, das 22 Mol Aminosäuren enthielt, war ein Arginin und ein Homoserin.

Daraus war zu schließen, daß ein Peptid mit C-terminalem Arg und das C-terminale Peptid des Fragments 3 mit endständigem Homoserin in Lösung gegangen waren.

Die Trennung dieser beiden Peptide wurde auf Sephadex G25 erreicht.

Der Bodensatz mit 68 Mol Aminosäuren, darunter 2 Mol Arg, konnte nur in 80 %iger Ameisensäure gelöst werden.

Da nach dem Arginingehalt zwei Peptide zu erwarten waren, wurde versucht, diese auf Biogel P 10 zu trennen. Eine Trennung wurde nicht erreicht. Dies ist in Einklang mit

den Untersuchungen von Brockway und Castellino¹¹⁾,
wonach in dem N-terminalen Teil der Streptokinase und
damit auch des Fragments 3 eine durch Trypsin nicht an-
greifbare Arg-Pro-Bindung enthalten ist.

3. Ausgangsmaterialien und Apparaturen

Streptokinase wurde von den Behring-Werken AG, Marburg/Lahn zur Verfügung gestellt.

Bromcyan wurde von der Firma Serva, Heidelberg bezogen.

Trypsin, vom Rind, TPCK behandelt, lyophilisiert, 3,5 U/mg von der Firma Merck, Darmstadt.

Für die säulenchromatische Auftrennung nach der BrCN-Spaltung wurde Sephadexgel, G 100 Partikelnummer 40 - 120, für die Auftrennung der tryptischen Peptide G 10 und G 25 der Firma Fine Chemicals AG, Uppsala/Schweden gebraucht. Die Abspaltung des Harnstoffs nach der BrCN-Spaltung erfolgte auf Biogel P 2, der Trennungsversuch des Peptids mit der Arg-Pro-Bindung auf Biogel P 10 der Firma Bio-Rad-Lab., Richmond, Cal., USA.

Das Citraconsäureanhydrid zur Lysinabschirmung wurde von der Firma Karl Roth, Karlsruhe, bezogen.

4. Versuchsbeschreibung und Versuchsergebnisse

BrCN-Spaltung der Streptokinase

In einem 100 ml Kolben mit NS 29 Schliff werden zu 100 mg (2,5 μ Mol) Streptokinase, gelöst in 2,5 ml 70 %iger Ameisensäure 120 mg (1,13 mMol) BrCN, gelöst in 2,5 ml 70 %iger Ameisensäure gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden, bei 24° C wird das Reaktionsprodukt mit 45 ml Wasser versetzt, eingefroren und lyophilisiert. Dabei wird das BrCN entfernt.

Trennung der Methioninbruchstücke

Die Fragmente werden in 10 ml 1 N - Essigsäure mit 6,75 M-Harnstoff versetzt aufgenommen und auf eine 250 cm lange, 26 mm $\varnothing$ Säule mit Sephadex G 100 aufgebracht. Die Säule wurde vorher mit dem Gel, aufgeschwemmt in 1 N-Essigsäure und 6.75 M-Harnstoff, gefüllt und anschließend mit 2 l des gleichen Lösungsgemisches gewaschen. Die Registrierung der nun aufgetrennten Fragmente erfolgte mit dem Absorbance-Monitor UA - 5. Der Versuch läuft ohne Pumpe bei 24° C. Pro Stunde wurde eine Fraktion mit 15 ml aufgefangen. Ein Säulenlauf dauerte 4 Tage. Die einzelnen Fraktionen wurden im Fraktionsteiler auf-

gefangen und anschließend entsprechend ihrer Zuordnung zusammengegeben. Registrierung bei 280 nm; $E = 0.5$. Der Harnstoff wurde auf Biogel P 2 wieder abgetrennt.

Die Säulen für die chromatographische Trennung waren für die BrCN-Spaltung 250 cm lang, $\varnothing$ 26 mm; für die Abspaltung der Citraconsäure auf G 10: 34 cm lang, $\varnothing$ 17 mm.

Für die Trennung auf G 25 und P 10: Länge 1300 cm, $\varnothing$ 9 mm.

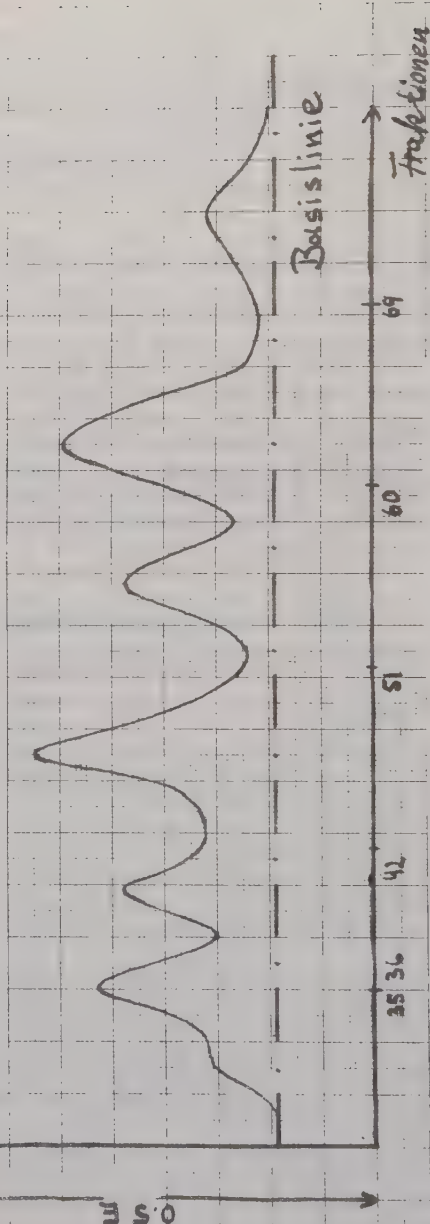
Die Registrierung der Fragmente erfolgte auf einem Absorbance Monitor UA - 5 der Firma Isco, Lincoln, Nebraska, USA bei 280 nm, bzw. auf Zeiss M 4 Q III, ebenfalls bei 280 nm.

Die Bruchstücke wurden auf dem automatischen Aminosäureanalysator der Firma Durrum, USA analysiert.

E

0.5 m

Sephadex G-100
(Übertragene Absorbance-Monitor UA-5-Kurve)



Elutionsmittel 1N-Essigsäure, 6,75M-Harnstoff

Hydrolyse der Fragmente nach der Bromcyanspaltung

Zur Hydrolyse für den Aminosäureanalysator werden maximal 10 nMol eines Fragmentes mit 1 ml 6 N - Salzsäure unter N_2 24 Stunden bei $110^\circ C$ zur Reaktion gebracht.

Zusätzlich noch ein Kristall Phenol.

Dabei gibt man die Reaktionsteilnehmer in ein Schliffglas NS - 14, evakuiert, wäscht fünfmal mit N_2 aus und läßt sie im Druckglas 24 Stunden bei $110^\circ C$ im Heizofen reagieren.

Anschließend wird das Reaktionsprodukt zur Trockne einge-
rotiert und auf dem Aminosäureanalysator charakterisiert.

T a b e l l e I

Aminosäurenzusammensetzung der Streptokinase und ihrer
Bromcyanfragmente

Vergleich unserer mit den Werten von Morgan und Henschen¹⁴⁾
(in Klammern)

Aminosäure	Streptokinase	Fragment				
		1	2	3	4	5
Ala	21 (22)	10 (9)	4 (4)	5 (5)	2 (2)	- (-)
Arg	18 (19)	5 (5)	6 (6)	2 (3)	4 (4)	1 (1)
Asp	65 (67)	23 (22)	18 (20)	11 (11)	8 (7)	6 (6)
Cys	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Glu	48 (45)	18 (16)	13 (12)	10 (8)	6 (6)	1 (1)
Gly	23 (20)	7 (6)	4 (4)	8 (7)	3 (3)	1 (1)
His	8 (9)	4 (4)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Hom	4 (4)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	- (-)	1 (1)
Ile	22 (22)	11 (10)	4 (6)	4 (4)	1 (1)	2 (1)
Leu	41 (39)	16 (14)	13 (14)	9 (7)	2 (2)	1 (1)
Lys	31 (34)	12 (11)	10 (12)	5 (6)	3 (3)	1 (1)
Met	4 (4)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Phe	13 (15)	6 (6)	4 (5)	3 (3)	- (-)	- (-)
Pro	25 (21)	10 (9)	3 (4)	7 (5)	4 (4)	- (-)
Ser	23 (26)	8 (9)	5 (6)	8 (7)	2 (2)	- (-)
Thr	30 (28)	12 (11)	5 (6)	6 (6)	3 (3)	4 (4)
Tyr	21 (21)	6 (5)	7 (7)	1 (2)	5 (5)	2 (2)
Val	21 (23)	9 (9)	4 (5)	5 (5)	1 (1)	2 (2)
Total	425 (416)	158 (147)	102 (113)	87 (82)	44 (44)	23 (22)

Citraconylierung von Fragment 3

In einem Präparategläschen mit Magnetprüher werden 3 mg (ca. $0.3 \mu\text{Mol}$) Fragment 3 mit 0,4 ml NH_4Ac - Puffer versetzt und mit 2 N-NaOH auf pH 8.3 gebracht. Dazu gibt man 5 μl (ca. $50 \mu\text{Mol}$) Citraconsäureanhydrid und rührt 15 Stunden bei 24°C . Anschließend gibt man nochmals 5 μl (ca. $50 \mu\text{Mol}$) Citraconsäureanhydrid zu und rührt weitere 2 Stunden.

Das Reaktionsprodukt wird lyophilisiert.

Trypsinspaltung von Fragment 3

In einem Präparategläschen gibt man zu 200 μg (ca. 6.8 nMol) Trypsin, gelöst in 2 ml 0,05 M- NH_4Ac (incl. 0,002 % Chlorhexidinlösung) 3 mg (ca. $0.3 \mu\text{Mol}$) citraconyliertes Fragment 3. Es wird 2 Stunden bei 24°C gerührt und anschließend lyophilisiert.

Das Enzym - Substratverhältnis soll 1 : 50 bis 100 sein.

Abtrennung der Citraconsäure

Der lösliche Teil des gespaltenen Fragments 3 wurde in 1 ml 30 %iger HCOOH aufgenommen und auf Sephadex - G 10 chromatographiert. Die Säule ist 34 cm lang, $\varnothing$ 17 mm.

Das Gel wurde in 30 %iger HCOOH aufgeschwemmt und mit diesem gleichen Elutionsmittel gewaschen. Die Registrierung war bei 280 nm, $E = 0.5$, 2 Fraktionen wurden à 3 - 4 ml pro Stunde aufgefangen. Das Elutionsmittel lief bei 24° C mit einer Pumpe über die Säule.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf dem Absorbance-Monitor UA - 5 registriert.

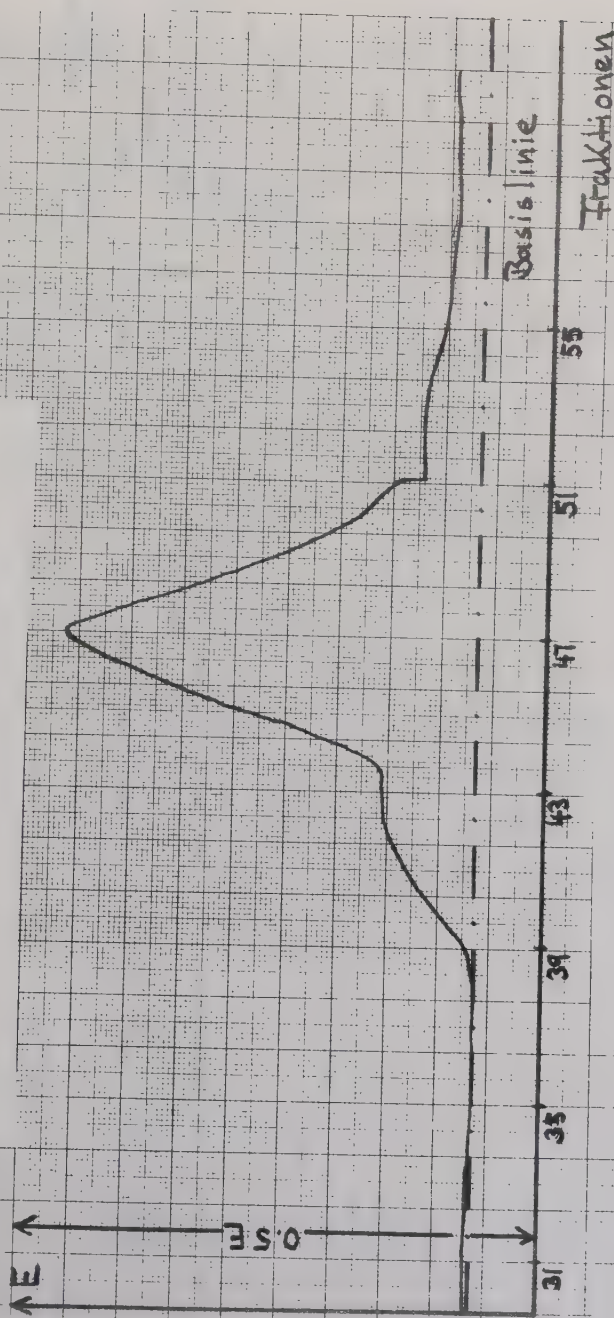
Sie wurden im Fraktionsteiler aufgefangen und entsprechend ihrer Zuordnung zusammengegeben.

Die Kurve zeigte drei Maxima, wobei das letzte große der Citraconsäure zuzuordnen ist. Die beiden ersten wären dann die beiden kleineren Fragmente aus der tryptischen Spaltung (siehe Tabelle II). Diese beiden wurden auf Grund ihrer Molekülgröße auf Sephadex G 25 chromatographiert.

Trennung der tryptischen Peptide auf Sephadex G - 25

Die Fraktionen 11 - 21 aus dem Säulenlauf Sephadex G 10 wurden zusammengenommen, zur Trockne einrotiert und in 1 ml 30 %iger HCOOH aufgenommen. Diese Lösung wurde auf einer Säule mit der Länge 130 cm, Ø 9 mm, Gel Sephadex G-25 in 30 %iger HCOOH aufgebracht. Mit einer Pumpe laufen 2 Fraktionen à 1,6 ml/Std. durch. Die Registrierung erfolgte bei 280 nm, $E = 0.5$, Reaktionstemperatur 24° C.

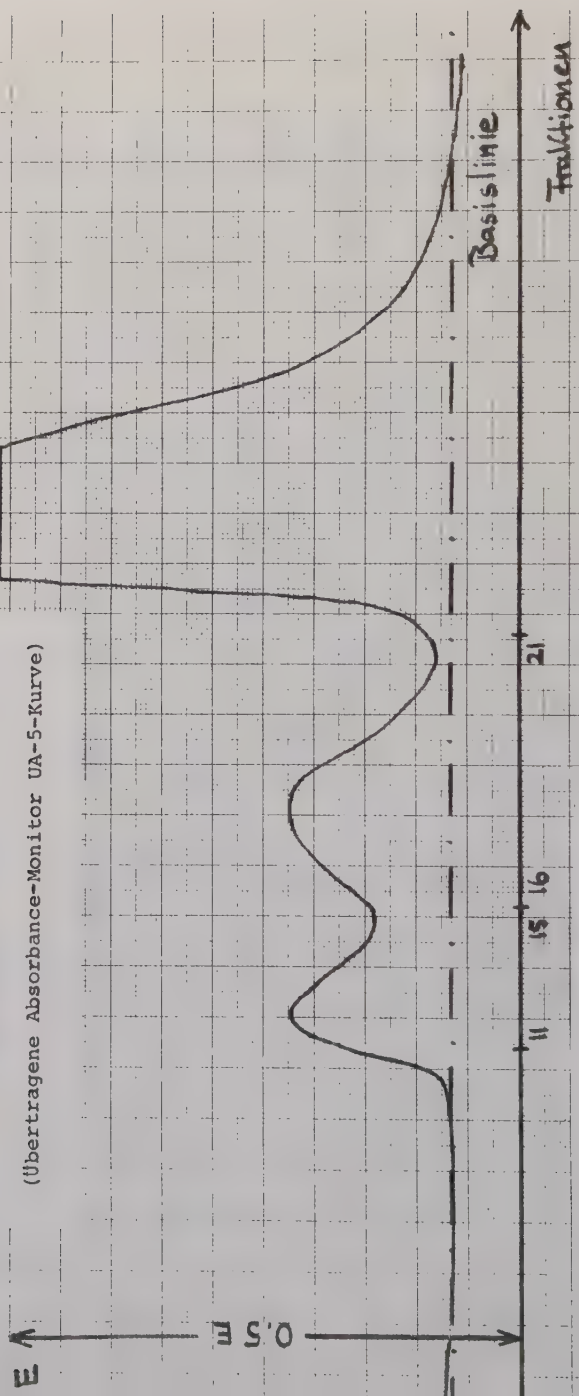
Sephadex G-25
(Übertragene Absorbance-Monitor UA-5-Kurve)



Elutionsmittel 30%ige Ameisensäure

Sephadex G-10

(Übertragene Absorbance-Monitor UA-5-Kurve)



Elutionsmittel 30-%ige Ameisensäure

Aufarbeitung des ungelösten Rückstandes der Tryptischen
Peptide

Der ungelöste Rückstand von Fragment 3 nach der Trypsinspaltung wurde in 80 %iger HCOOH gelöst.

Zur Reinigung des Peptids wurde diese auf Biogel P 10 chromatographiert. Die Säule war 130 cm lang, Ø 9 mm.

Die Pumpe lieferte 2 Fraktionen à 1,65 ml/Std.

Das gereinigte Peptid wurde ebenso wie die beiden kleineren Peptide aus Sephadex G - 25 hydrolysiert und auf dem automatischen Aminosäureanalysator charakterisiert.

Die Hydrolyse erfolgte, wie bereits beschrieben, in jeweils 1 ml 6 N-Salzsäure, unter N₂, bei 110°C, Reaktionsdauer 24 Stunden.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle II zusammengefaßt:

T a b e l l e II

Aminosäurezusammensetzung und Molekulargewicht von Fragment
3 und seiner tryptischen Peptide

Aminosäuren	Fragment 3	G 10	G 25	P 10
	gesamt	lösli. in 30 %iger HCOOH	lösli. in 80 %iger HCOOH	
		gesamt	1. Max 2.	
Ala	5	2	1	4
Arg	2	1	-	2
Asp	11	3	2	7
Cys	-	-	-	-
Glu	10	2	1	8
Gly	8	2	1	7
His	1	-	-	1
Hom	1	1	1	-
Ile	4	1	1	3
Leu	9	2	1	7
Lys	5	2	2	4
Met	-	-	-	-
Phe	3	-	-	3
Pro	7	1	1	4
Ser	8	2	1	8
Thr	6	2	2	5
Try	1	-	-	-
Tyr	1	1	-	-
Val	5	1	1	5
Total	93	23	15	68
Molekulargewicht	9393	2464	1573	909
				7154

Aus den Tabellenwerten ist ersichtlich, daß die Analysenergebnisse des gesamten Fragments 3 von denen der aufgetrennten Peptide in manchen Aminosäurewerten geringfügig abweichen.

Die genaueren Werte ergeben sich aus den aufgetrennten Peptiden.

5. Diskussion

Auf Grund der bei den Versuchen verwendeten längeren Säulen konnte eine bessere Trennung der Peptide als in vorherigen Arbeiten¹⁴⁾ erreicht werden.

Dabei zeigt sich, daß vor den eigentlichen BrCN-Peptiden 1 - 5 einige weitere Substanzen erscheinen (vergl. Kurve Sephadex G - 100). Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um an den Methioninschwefelatomen partiell oxidierte Bruchstücke, die bei der BrCN-Spaltung nicht mehr angegriffen werden.

Ebenso wie die anderen Fragmente, war auch das Fragment 3 nach seiner Aminosäurezusammensetzung genügend rein, um es unmittelbar zur weiteren Sequenzermittlung zu verwenden. Es war schwierig, die erhaltenen tryptischen Peptide in Lösung zu bringen.

In 30%iger Ameisensäure konnten zwei der zu erwartenden vier Bruchstücke gelöst werden; das restliche Peptidmaterial löste sich erst in 80 %iger Ameisensäure.

Dies erscheint verständlich, wenn man die Aminosäurezusammensetzung des Peptidfragmentes in Betracht zieht. Circa 50 % der Aminosäuren sind hydrophob, nämlich Pro, Ala, Val, Ileu, Leu und Phe.

Das restliche Peptidmaterial enthält zwei Argininreste.

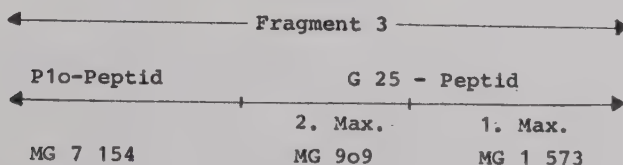
Wir erhielten aber statt der zu erwartenden zwei Fragmente keine Spaltung. Dies stimmt mit den von Brockway und Castellino¹¹⁾ im Sequenator gefundenen Arg-Pro-Bindungen, die mit Trypsin nicht spaltbar sind, überein.

Die Absicht dieser Arbeit war es, Peptide zu bekommen, die ihrer Größe nach geeignet waren, im Sequenator an einem Stück quantitativ sequenziert zu werden.

Dies gelang bei den beiden kleineren, mit einem Molekulargewicht von 1573 und 909. Das verbleibende große Peptid mit einem Molekulargewicht von 7 154 und annähernd 70 Aminosäuren muß dagegen weiter enzymatisch aufgespalten werden. Dafür bieten sich die vier Lysinreste mit Trypsin oder die drei Phenylalaninreste mit Chymotrypsin an.

Es sollten dann fünf bzw. vier kleinere Fragmente erhalten werden.

Auf Grund der Aminosäurezusammensetzung ergibt sich eindeutig, daß das P10-Peptid (MG 7154) den N-terminalen Teil des Fragments 3 darstellt. Ebenso ist das Peptid G 25, 1. Max. (MG 1 573) durch das Homoserin als C-terminales Peptid charakterisiert. Damit liegt das Peptid G 25, 2.Max. (MG 909) zwischen beiden genannten.



6. Zusammenfassung

Streptokinase wurde mittels Bromcyan an den Methioninresten in fünf Bruchstücke gespalten.

Das sogenannte Fragment 3 wurde citraconyliert und mit Trypsin in drei Fragmente, mit einem Molekulargewicht von 1 573, 909 und 7 154, zerlegt.

Aus ihrer Aminosäurezusammensetzung ergibt sich eindeutig ihre Anordnung im Fragment 3.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Hoffmann-Axthelm, Lexikon der Zahnmedizin Berlin, 1974
- 2) N. Heimbürger, H.G. Schwick
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, 1 439 (1971),
Aulendorf i. Württ.
- 3) N. Heimbürger, H.G. Schwick
Thrombos. Diathes. haemorrh. I, 444 (1962)
- 4) L. Summaria, B. Hsieh, K.C. Robbins
J. Biol. Chem. 242, 4279 (1967)
- 5) L. Summaria, B. Hsieh, K.C. Robbins
J. Biol. Chem. 242, 2333 (1967)
- 6) W.F. Blatt, J. Zylber, J.L. Gray, A. Jensen
Fed. Proc. 19, 60 (1960)
- 7) K. Nagendra Nath Reddy, G. Markus
Biochem. an Biophys. Res. Comm. 51, Nr. 3 (1973)
- 8) E.C. Renzo, E. Boggiano, W.F. Borg, F.F. Buck
J. Biol. Chem. 242, 2428 (1967)
- 9) L. Summaria, K.C. Robbins
J. Biol. Chem. 246, 2136 (1971)
- 10) D.K. Mc Clintock et al.
Biochem. 13, Nr. 26, 5334 (1974)
- 11) W.J. Brockway, F.J. Castellino
Biochem. 13, Nr. 10, 2063 (1974)

- 12) K. Nagendra Nath Reddy, G. Markus
J. Biol. Chem. 247, Nr. 6 1683 (1972)
- 13) E.C. De Renzo et al.
J.Biol. Chem. 242, 533 (1967)
- 14) F.J. Morgan, A. Henschen
Biochem. Biophys. Acta 181, 93 (1969)
- 15) E. Gross, B. Witkop
J.Am. Chem. Soc. 83, 1510 (1961)
- 16) H.B.F. Dixon et al.
Biochem. J. 109, 312 (1968)
- 17) P.J.G. Butler et al.
Biochem. J. 103, 78 P (1967)
- 18) P.J.G. Butler et al.
ibid. 112, 679 (1969)
- 19) S.B. Needleman, Protein Sequenz Determination
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1970) S.155
- 20) P. Edmann, G. Begg
Europ. J. Biochem. 1, 80 (1967)
- 21) T.A.A. Dopheide et al.
J. Biol. Chem. 242, 1833 (1967)

Lebenslauf

geb.: 3. 11. 1946, Selb

Vater: Hans Bayreuther, Schmiedemeister

Mutter: Anni Bayreuther, geb. Mühleis, Hausfrau

Volksschule: 1953 - 1957, Selb

Gymnasium: 1957 - 1966, Selb

Studium der Chemie: 1966 - 1968, Clausthal-Zellerfeld

1969 Göttingen

Hauptdiplom Chemie: Dez. 1969, Göttingen

Assistent a.d. Universität Bochum, Chemie, 1970 - 1972

Promotion Chemie: Feb. 1972, Bochum

Studium der Zahnheilkunde: 1972 - 1977, München

Zahnärztliche Prüfung: 11. 3. 1977, München

Bestallung als Zahnarzt: 30. 3. 1977, München

Promotion Zahnheilkunde: März 1975 - Juni 1977, München

